

細胞の形態と運動性を制御する細胞センシング機構

著者	水野 健作
URL	http://hdl.handle.net/10097/39799



細胞の形態と運動性を制御する細胞センシング機構

(課題番号 13GS0010)

平成13年度～平成17年度科学研究費補助金
(学術創成研究費)研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 水 野 健 作

(東北大学・大学院生命科学研究科・教授)

細胞の形態と運動性を制御する細胞センシング機構

(課題番号 13GS0010)

平成13年度～平成17年度科学研究費補助金
(学術創成研究費) 研究成果報告書

平成18年3月

研究代表者 水 野 健 作

(東北大学・大学院生命科学研究科・教授)

【はしがき】

平成13年度から平成17年度の5年間にわたって、「細胞の形態と運動性を制御する細胞センシング機構」という研究課題で科学研究費補助金（学術創成研究費）の交付を受け、研究を行った。本補助金によって共焦点顕微鏡等の設備備品を整備することができたことは、研究を遂行するうえで非常に有効であった。成果報告にあたり、まず謝意を表したい。

アクチン細胞骨格の再構築は、細胞の形態変化、運動、極性形成、接着、分裂など細胞の動的活動を支える重要な役割を果たしており、ひいては、胚発生、器官形成、神経系構築など個体の発生過程や、癌転移、免疫疾患、神経疾患など多くの疾病の発症にも深く関わっている。したがって、アクチン細胞骨格の再構築を制御するアクチン結合蛋白質の機能やその上流のシグナル伝達経路を解明することは、これら多くの生命現象を理解するために必須の課題である。私達は、1994年に新規なプロテインキナーゼとしてLIMキナーゼを同定し、1998年にはLIMキナーゼがアクチン脱重合因子であるコフィリンのSer-3を特異的にリン酸化（不活性化）し、アクチン線維の重合と安定化を誘導することを明らかにした。さらに、1998年から2000年にかけて、LIMキナーゼは低分子量G蛋白質Rac, Rhoの下流因子として活性化されることを見出し、アクチン骨格制御におけるRac/Rho→(Pak)/ROCK→LIMキナーゼ→コフィリンというシグナル伝達経路の存在を明らかにした。コフィリンはアクチン骨格の再構築を制御する最も重要な因子の一つであり、これらの成果は、細胞外シグナルとアクチン細胞骨格の制御をつなぐ主要なシグナル伝達経路の発見として高い評価を受けた。本研究費はこの時期に採択されたものである。本研究では、コフィリンの活性を制御する正と負のシグナル経路とその時間的・空間的制御機構を解明し、細胞の形態変化、遊走、極性形成、分裂や、神経ガイダンス、神経可塑性、癌細胞浸潤、血管新生などの生理的諸過程におけるアクチン骨格制御経路の役割を解明することを目的とした。本研究の結果として、コフィリンを脱リン酸化（活性化）するホスファターゼとしてSlingshotファミリーの同定、LIMキナーゼとSlingshotを活性制御する新たなシグナル伝達機構の解明、細胞遊走時におけるコフィリン活性の時空的制御機構の解明、細胞分裂、神経ガイダンス、神経可塑性、癌細胞浸潤、血管新生におけるLIMキナーゼとSlingshotの役割の解明などで成果を挙げることができた。本研究で得られた研究成果を基にして、さらに細胞骨格、細胞運動の制御機構の解明に向けて研究を発展させていく覚悟であり、本報告書に対する各位のご指導ならびにご批判をおおぎたいと願っている。

最後に、本研究の遂行にあたり、研究協力者、共同研究者の方々のご協力とご指

導に深く感謝申し上げます。また、本研究費の申請にあたりご推薦いただきました加藤征史郎教授ならびに貴重なご助言をいただきました評価委員の先生方に深く感謝申し上げます。

【研究組織】

研究代表者：水野健作（東北大学大学院生命科学研究科教授）

研究分担者：大橋一正（東北大学大学院生命科学研究科助教授）

研究協力者：十島二郎、大橋（永田）恭子、西田 満、十島純子、
Neng Yang、Yan Wang、天野徹、遠藤光晴、梶 紀子、
小林美穂、津村義和、富吉 郷、森 玲子、山本将広、
太田裕作、後藤一路、執印美加、千葉秀平、富沢千夏、
堀田祐司、村本 朱、三嶋利明

共同研究者：上村 匡、丹羽隆介、竹市雅俊、高坂和芳、成宮 周、
藍沢広行、矢原一郎、野田哲生、渡邊建彦、鈴木和博、
井ノ口薫、鈴木 聡、Onno Leeksma、Pauline Verdijk、
佐々木幸生、五嶋良郎、辻 孝、岩松明彦、芝崎 太、
北川誠一（順不同）

【交付決定額（配分額）】

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成13年度	63,000,000	18,900,000	81,900,000
平成14年度	68,500,000	20,550,000	89,050,000
平成15年度	68,500,000	20,550,000	89,050,000
平成16年度	66,000,000	19,800,000	85,800,000
平成17年度	65,500,000	19,650,000	85,150,000
総 計	331,500,000	99,450,000	430,950,000

【研究成果の概要】

アクチン細胞骨格系は、細胞内外のシグナルに応答してダイナミックに再構築され、細胞の形態変化、移動、分裂など細胞の動的な基本活動を支える重要な役割を担っている。細胞が正常に機能するためには、細胞内外のシグナルを感知し、アクチン細胞骨格の再構築を時間的・空間的に制御するシステムの存在が考えられるが、細胞骨格の再構築を統御し、細胞の形態と運動性を制御する細胞センシングと応答機構の多くは不明である。私たちは、アクチン細胞骨格の再構築制御における Rac, Rho→LIM キナーゼ (LIMK)→コフィリン経路の存在を明らかにした。コフィリンはアクチンの重合・脱重合を制御する最も重要な因子の一つであり、その活性制御機構の解明は、アクチン細胞骨格の制御機構を理解するうえで必須である。本研究は、コフィリンの活性を制御するシグナル伝達経路を中心に、アクチン細胞骨格の再構築を制御するシグナル伝達機構を解明し、細胞の形態変化、運動、分裂の諸過程におけるこれらの経路の役割を解明することを目的とした。さらに、白血球の遊走、癌細胞の浸潤・転移、神経突起の伸展・退縮、細胞質分裂、血管新生など細胞の形態変化や運動性が関わる多くの生命現象の分子機序を解明することを目的とした。本研究において、私たちは、コフィリンの脱リン酸化（活性化）を誘導するコフィリンホスファターゼ Slingshot ファミリーの同定に成功した。本成果は、以前のコフィリンキナーゼとしての LIMK の同定とともに、リン酸化・脱リン酸化によるコフィリンの正と負の制御機構を世界に先駆けて解明したものである。さらに、私たちは独自のアプローチによって、新規な LIMK の活性化経路や Slingshot の時空的活性制御機構を解明し、コフィリンのリン酸化制御が細胞遊走（極性形成）、細胞分裂、神経突起の伸長・退縮、血管新生、癌細胞の浸潤において重要な役割を果たしていることを解明した。本研究で得られた成果が、細胞の運動と形態変化の分子機構の理解を促進し、胚発生、創傷治癒、癌細胞転移、神経ガイダンス、シナプス可塑性など多くの生命現象の分子機構解明にも貢献できるものと期待している。この5年間の研究期間に得た主な研究成果は以下の通りである。

1) コフィリンホスファターゼ Slingshot の同定：コフィリンはアクチン細胞骨格の再構築を制御する主要因子の一つであり、その活性制御機構の解明は細胞の形態形成、運動性を理解するうえで必須である。種々の細胞外刺激に応答してコフィリンが脱リン酸化（活性化）されることが報告されていたが、コフィリンホスファターゼの実体は長年不明であった。京大上村研究室では翹毛・剛毛の形態異常を示すショウジョウバエ変異体の解析からアクチンの過重合を表現型とするホスファタ

ーゼ(Slingshot)遺伝子の変異体を同定した。この表現型は LIMK を過剰発現した細胞の表現型と類似していることから、上村らはコフィリンのホスファターゼである可能性を検討した。私たちは上村研究室との共同研究により、ハエ Slingshot 及び3種のヒト Slingshot ホモログがコフィリンの Ser-3 を特異的に脱リン酸化するホスファターゼであることを生化学的、細胞生物学的解析により証明した。Slingshot ファミリーは、MAPK ホスファターゼと遠縁の新規ホスファターゼで、LIMK によるアクチン重合作用を中和することを明らかにした (Niwa et al., Cell, 2002; Ohta et al., Genes Cells, 2003)。本酵素の同定は、細胞骨格の制御機構の解明にとどまらず、細胞移動、極性形成、神経系構築など多くの細胞活動の理解を格段に前進させる重要な知見として、Cell 誌や Developmental Cell 誌の review で紹介されるなど学術的に高い評価を受けている。

2) Slingshot の活性化機構: コフィリンはアクチン繊維のターンオーバーを促進し、移動細胞の先端端での仮足形成と極性形成に必須の役割を果たしていると考えられている。私たちは、Slingshot がケモカインや増殖因子の刺激により移動細胞先端端のラメリポディアに集積することに着目し、Slingshot がアクチン繊維との結合によって著しく活性化されることを見出した。また、Slingshot-1 は Ser-937, Ser-978 のリン酸化依存的に 14-3-3 蛋白質と結合し、それによってアクチン繊維への結合と活性化が阻害されることを明らかにし、図1のような Slingshot 活性化機構のモデルを提出した (Nagata-Ohashi et al., J. Cell Biol., 2004)。すなわち、刺激前の細胞では Slingshot は 14-3-3 によってアクチン繊維による活性化から保護されているが、刺激によって 14-3-3 から解離し先端端に移行してアクチン繊維によって活性化され、コフィリンの脱リン酸化 (活性化) を介してアクチンのターンオーバーを促進し、細胞移動に必要なラメリポディアの伸展に寄与しているというモデルである。以上の結果は、アクチン繊維が Slingshot とコフィリンの活性化を介して自己触媒的にターンオーバーを促進する機構を示したものであり、細胞極性形成の分子機構解明に向けた独創的な成果であると考えられる。また、Slingshot は PI3 キナーゼや Ca^{2+} /calcineurin シグナルの下流で活性化されることも明らかにした (Nishita et al., J. Biol. Chem., 2004; Wang et al., J. Biol. Chem., 2005)。

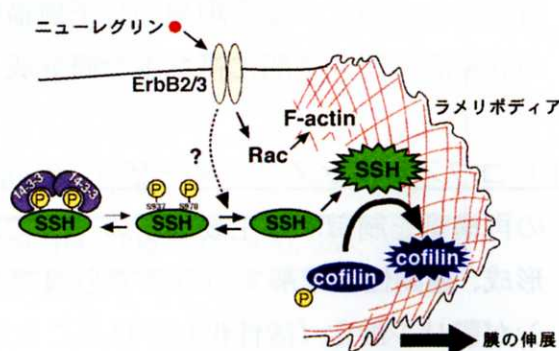


図1. Slingshot (SSH)の活性化機構のモデル

3) 細胞遊走におけるコフィリンのリン酸化・脱リン酸化の時空的制御の役割解

明：ケモカイン SDF-1 による T 細胞の遊走におけるコフィリンのリン酸化制御の役割を解明するため、LIMK、Slingshot、コフィリンの siRNA を行った。その結果、コフィリンはアクチン繊維のターンオーバーを維持するのに必須であること、LIMK はケモカイン刺激による安定なラメリポディアの形成に必須であること、Slingshot は仮足を一方向に局限して伸ばすのに必要であることを明らかにした (Nishita et al., J. Cell Biol., 2005)。また、SDF-1 刺激により LIMK は Rac を介して活性化され (Nishita et al., Mol. Cell. Biol., 2002)、図 2 に示したように LIMK と Slingshot の時間的・空間的な活性の制御が細胞移動時の極性形成に必須の役割を果たしていることを明らかにした (Nishita et al., J. Cell Biol., 2005)。

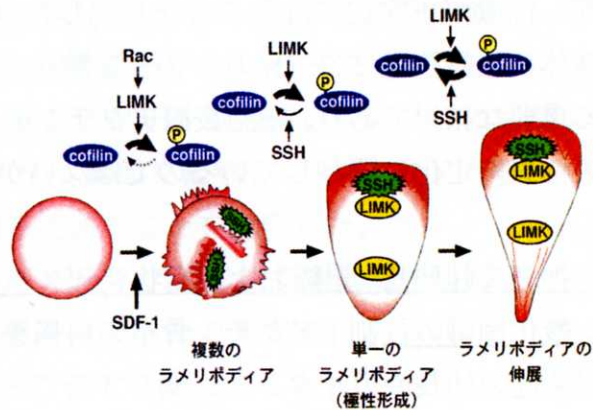


図2. LIMK と SSH による細胞極性形成のモデル

4) LIM キナーゼ活性化の新しいシグナル伝達経路の解明と血管新生における役

割：VEGF による血管内皮細胞の遊走や管腔形成の誘導過程において、LIMK の活性化とコフィリンのリン酸化が重要であることを見出した。血管内皮細胞を VEGF で刺激すると、p38 MAPK→MAPKAPK-2 経路が活性化され、MAPKAPK-2 により LIMK の Ser-323 がリン酸化され、活性化されることを解明した。LIMK の不活性型や Ser-323 の変異体の発現によって VEGF による細胞遊走や管腔形成が抑制されることを見出し、MAPKAPK-2 による LIMK の活性化経路の重要性を明らかにした (Kobayashi et al., EMBO J., 2006)。VEGF による血管新生は癌細胞の増殖、転移と深く関わっており、新たな LIMK シグナル経路の解明は血管新生阻害剤の開発につながる新たな知見である。

5) 細胞分裂におけるコフィリンのリン酸化制御の役割解明：細胞周期依存的なコ

フィリンのリン酸化レベルの変動を解析し、コフィリンは細胞分裂中期に顕著にリン酸化され分裂終期に脱リン酸化されることを見出した (Amano et al., J. Biol. Chem., 2002)。これと並行して、中期には LIMK のリン酸化と活性上昇な

らびに Slingshot のリン酸化と活性低下が、終期には LIMK の脱リン酸化と活性低下ならびに Slingshot の脱リン酸化と活性上昇が認められた。LIMK の過剰発現により終期のコフィリン脱リン酸化を阻害すると、細胞は多核化することを見出し、終期におけるコフィリンの脱リン酸化は細胞質分裂において必須の役割を果たしていることを明らかにした (Kaji et al., J. Biol. Chem., 2003)。また、LIMK の発現抑制により、中期のコフィリンのリン酸化を阻害すると、紡錘体が回転し位置が不安定になることを見出した (未発表)。この結果は、分裂中期の紡錘体の位置決定にコフィリンのリン酸化 (不活性化) が必須であることを示唆する重要な結果であり、細胞表層アクチンの安定化と星状体微小管の結合が紡錘体の位置安定化に関与しているのではないかと考えられる。

6) 神経突起伸長・退縮および樹状突起スパインの形態形成におけるコフィリンリン酸化制御の役割: アクチン骨格の再構築は神経成長円錐の運動性を制御し、神経突起の伸長やガイダンスに関与することが予想される。培養神経細胞において、LIMK の過剰発現は神経突起を退縮させ、Slingshot の過剰発現は突起伸長を促進することを見出した (Endo et al., J. Neurosci., 2003)。藍沢、矢原グループとの共同研究により、セマフォリン刺激による神経突起の退縮に LIMK の活性が必須であることを報告した (Aizawa et al., Nat. Neurosci., 2001)。また、siRNA を用いた解析により、NGF 刺激による神経突起の伸長には LIMK と Slingshot の両者の活性化が必要であることを明らかにした (未発表)。また、LIMK は樹状突起スパインの形態形成、可塑性に重要であることがノックアウトマウスの解析から示唆されているが、井ノ口研との共同研究により、海馬 LTP 刺激によってコフィリンのリン酸化レベルが上昇し、F アクチン量が上昇することを明らかにした (Fukazawa et al., Neuron, 2003)。これらの結果は、神経発生過程における軸索ガイダンスの分子機構およびシナプスの可塑性や学習、記憶の機構の解明において今後の発展が期待される重要な知見であると考えられる。

7) 癌細胞浸潤におけるコフィリンリン酸化制御の役割: 高浸潤性肝癌細胞 MM1 では低浸潤性の親株より LIMK と Slingshot の発現量が高く、siRNA により LIMK、Slingshot の発現を抑制すると浸潤能が抑制されることを見出した。これらの結果から、LIMK と Slingshot によるコフィリンのリン酸化サイクルの亢進が癌細胞の高浸潤能に関与していることが示された (未発表)。

8) コフィリンリン酸化動態の時空間的解析：コフィリンのリン酸化状態を生細胞でリアルタイム解析するためのプローブとして、コフィリンとアクチンからなるFRET プローブとBiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) プローブを作成した。これらのプローブは脱リン酸化型特異的に発色するが、細胞内の動態を観察するには適さないため、さらに改良が必要である（未発表）。

9) コフィリンの真の細胞機能の解明に向けて：コフィリンの細胞機能としては、アクチン脱重合活性によるGアクチンの供給とターンオーバーの促進説と、アクチン繊維切断活性による重合端の生成とアクチン重合促進説の2つの説がある。Dronpa-アクチンを用いて細胞内アクチン動態を観察し、コフィリンは細胞内にGアクチンを供給するために必須の因子であることを証明した。コフィリンを不活性化した細胞では刺激依存的なラメリポディアの形成や運動能が阻害されるが、これはGアクチン量の減少によることを証明した（未発表）。

【研究発表】

(1) 学会誌発表 (*は後ページに掲載している論文を示す)

- * 1. Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. LIM-kinase 2 induces the formation of actin stress fibers, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalyzed phosphorylation of threonine-505. *Biochem. J.*, 354, 149-159 (2001).
- 2. Yanagita, M., Arai, H., Ishi, K., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Varnum, B., Fukatsu, A., Doi, T., Kita, T. Gas6 regulates mesangial cell proliferation through Axl in experimental glomerulonephritis. *Am. J. Pathol.*, 158, 1423-1432 (2001).
- * 3. Toshima, J., Toshima, J. Y., Amano, T., Yang, N., Narumiya, S., and Mizuno, K. Cofilin phosphorylation by protein kinase TESK1 and its role in integrin-mediated actin reorganization and focal adhesion formation. *Mol. Biol. Cell*, 12, 1131-1145 (2001).
- * 4. Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., and Yahara, I. Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced

growth cone collapse. *Nature Neurosci.*, 4, 367-373 (2001).

- * 5. Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R., and Mizuno, K. Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells. *J. Biol. Chem.*, 276, 31449-31458 (2001).
- * 6. Toshima, J., Toshima, J. Y., Suzuki, M., Noda, T., and Mizuno, K. Cell type-specific expression of a TESK1 promoter-linked lacZ gene in transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 286, 566-573 (2001).
- 7. Wakayama, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Iseki, S. Cloning and characterization of a novel mouse immunoglobulin superfamily gene expressed in early spermatogenic cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 60, 158-164 (2001).
- 8. Yanagita M., Arai, H., Nakano, T., Ohashi, K., Mizuno, K., Fukatsu, A., Doi, T., and Kita, T. Gas6 induces mesangial cell proliferation via latent transcription factor STAT3. *J. Biol. Chem.*, 276, 42364-42369 (2001).
- * 9. Toshima, J. Y., Toshima, J., Watanabe, T., and Mizuno, K. Binding of 14-3-3beta regulates the kinase activity and subcellular localization of testicular protein kinase 1. *J. Biol. Chem.*, 276, 43471-43481 (2001).
- * 10. Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*, 108, 233-246 (2002)
- * 11. Nishita, M., Aizawa, H., and Mizuno, K. Stromal cell-derived factor-1alpha activates LIM-kinase 1 and induces cofilin phosphorylation for T cell chemotaxis. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 774-783 (2002)
- * 12. Matsui, S., Matsumoto, S., Adachi, R., Kusui, K., Hirayama, A., Watanabe, H., Ohashi, K., Mizuno, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., and Suzuki, K. LIM-kinase 1 modulates opsonized zymosan-triggered activation of macrophage-like U937 cells; possible involvement of phosphorylation of cofilin and reorganization of actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 277, 544-549 (2002)
- * 13. Leeksa, O. C., van Achterberg, T. A., Tsumura, Y., Toshima, J., Eldering, E.,

Kroes, W. G., Mellink, C., Spaargaren, M., Mizuno, K., Pannekoek, H., and de Vries, C. J. Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur. J. Biochem.* 269, 2546-2556 (2002).

- * 14. Amano, T., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. Mitosis-specific activation of LIM-kinase and roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation in mitosis. *J. Biol. Chem.*, 277, 22093-22102 (2002).
- * 15. Endo, M., Ohashi, K., Sasaki, Y., Goshima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Control of growth cone motility and morphology by LIM-kinase and Slingshot via phosphorylation and dephosphorylation of cofilin. *J. Neurosci.*, 23, 2527-2537 (2003).
- * 16. Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., and Inokuchi, K. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*, 38, 447-460 (2003).
- * 17. Kaji, N., Ohashi, K., Shuin, M., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Cell cycle-associated changes in Slingshot phosphatase activity and roles in cytokinesis in animal cells. *J. Biol. Chem.*, 278, 33450-33455 (2003).
- * 18. Ohta, Y., Kousaka, K., Nagata-Ohashi, K., Ohashi, K., Muramoto, A., Shima, Y., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Differential activities, subcellular distribution, and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin. *Genes Cells*, 8, 811-824 (2003).
- 19. Kutsuna, H., Suzuki, K., Kamata, N., Kato, T., Hato, F., Mizuno, K., Kobayashi, H., Ishii, M., and Kitagawa, S. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF and G-CSF: role of mitogen-activated protein kinases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 286, C55-C64 (2004).
- 20. Verdijk, P., van Veelen, P. A., de Ru, A. H., Hensbergen, P. J., Mizuno, K., Koerten, H. K., Koning, F., Tensen, C. P., and Mommaas, A. M. Morphological changes during dendritic cell maturation correlate with cofilin activation and translocation to the cell membrane. *Eur. J. Immunol.*, 34, 156-164 (2004).

- * 21. Nishita, M., Wang, Y., Tomizawa, C., Suzuki, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J. Biol. Chem.*, 279, 7193-7198 (2004).
- * 22. Konakahara, S., Ohashi, K., Mizuno, K., Itoh, K., and Tsuji, T. CD29 integrin- and LIMK1/cofilin-mediated actin reorganization regulates the migration of hematopoietic progenitor cells underneath bone marrow stromal cells. *Genes Cells*, 9, 345-358 (2004).
- * 23. Tomiyoshi, G., Horita, Y., Nishita, M., Ohashi, K., and Mizuno, K. Caspase-mediated cleavage and activation of LIM-kinase 1 and its role in apoptotic membrane blebbing. *Genes Cells*, 9, 591-600 (2004).
- * 24. Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Goto, K., Chiba, S., Mori, R., Nishita, M., Ohashi, K., Kousaka, K., Iwamatsu, A., Niwa, R., Uemura, T., and Mizuno, K. A pathway of neuregulin-induced activation of cofilin-phosphatase Slingshot and cofilin in lamellipodia. *J. Cell Biol.*, 165, 465-471 (2004).
- 25. Okamoto, N., Nukada, Y., Tezuka, K., Ohashi, K., Mizuno, K., and Tsuji, T. AILIM/ICOS-signaling induces T-cell migration/polarization of memory/effector T-cells. *Int. Immunol.*, 16, 1515-1522 (2004).
- * 26. Wang, Y., Shibasaki, F., and Mizuno, K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.*, 280, 12683-12689 (2005).
- * 27. Tsumura, Y., Toshima, J., Leeksa, O. C., Ohashi, K., and Mizuno, K. Sprouty-4 negatively regulates cell spreading by inhibiting the kinase activity of testicular protein kinase. *Biochem. J.* 387, 627-637 (2005).
- * 28. Fukuda, R., Hayashi, A., Utsunomiya, A., Nukada, Y., Fukui, R., Itoh, K., Tezuka, K., Ohashi, K., Mizuno, K., Sakamoto, M., Hamanoue, M., and Tsuji, T. Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in multilobulated nuclear formation of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 15213-15218 (2005).
- * 29. Nishita, M., Tomizawa, C., Yamamoto, M., Horita, Y., Ohashi, K., and Mizuno K.

Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM-kinase and Slingshot is critical for directional cell migration. *J. Cell Biol.*, 171, 349-359 (2005).

*30. Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. MAPKAPK-2- mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *EMBO J.*, 25, 713-726 (2006).

*31. Yamamoto, M., Nagata-Ohashi, K., Ohta, Y., Ohashi, K., and Mizuno, K. Identification of multiple actin-binding sites in cofilin-phosphatase Slingshot-1L. *FEBS Lett.*, 580, 1789-1794 (2006).

(2) シンポジウム、ワークショップ、国際学会等での発表（抜粋）

(2001 年)

遠藤光晴、大橋一正、水野健作

神経成長円錐の運動性制御における LIM キナーゼの役割

第74回日本生化学会大会（シンポジウム口演）、京都、2001.10.25-28

水野健作

細胞骨格の動的制御における LIM キナーゼ-コフィリン経路の役割

第24回日本分子生物学会年会（シンポジウム）、横浜、2001.12.9-12（招待講演）

丹羽隆介、永田一大橋恭子、Bruce HAY、竹市雅俊、水野健作、上村 匡

アクチン細胞骨格の再編成を制御するフォスファターゼ Slingshot：コフィリンの脱リン酸化

第24回日本分子生物学会年会（ワークショップ口演）、横浜、2001.12.9-12

大橋一正、遠藤光晴、佐々木幸生、五嶋良郎、水野健作

脊髄後根神経節細胞の軸索伸展・退縮における LIM キナーゼ1の機能解析

第24回日本分子生物学会年会（ワークショップ口演）、横浜、2001.12.9-12

(2002 年)

丹羽隆介、永田（大橋）恭子、竹市雅俊、水野健作、上村 匡

Control of actin reorganization by Slingshot, a novel family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin.

第55回日本細胞生物学会大会（シンポジウム口演）、横浜、2002. 5. 21-23

大橋一永田恭子、丹羽隆介、大橋一正、上村 匡、水野健作

新規コフィリンホスファターゼ Slingshot によるアクチン細胞骨格の制御

第75回日本生化学会大会（シンポジウム口演）、京都、2002. 10. 14-17

大橋一正、渡邊琢也、大橋一永田恭子、水野健作

LIM キナーゼ-コフィリン経路によるアクチン骨格の制御機構

第25回日本分子生物学会年会（シンポジウム口演）、横浜、2002. 12. 11-14

大橋一永田恭子、丹羽隆介、太田裕作、大橋一正、上村 匡、水野健作

新規コフィリンホスファターゼ Slingshot の構造-活性相関解析

第25回日本分子生物学会年会（ワークショップ口演）、横浜、2002. 12. 11-14

M. Nishita, K. Goto, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno

Roles of LIM-kinase and Slingshot in SDF-1 α -induced T-cell migration.

The 42nd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 14-18, 2002.

（2003 年）

Kensaku Mizuno, Michiru Nishita, Kazumichi Goto, Ryusuke Niwa, and Tadashi Uemura

LIM-kinase and Slingshot regulate SDF-1 α -induced T-cell migration.

Keystone Symposium on "Cell Migration and Invasion", Beaver Run Resort, USA, Jan 18-23, 2003.

水野健作

細胞骨格、細胞運動を制御するシグナル伝達

第3回学際ライフサイエンスシンポジウム（招待講演）、仙台、2003. 4. 22

渡邊琢也、大橋一正、丹羽隆介、上村 匡、水野健作

LIM キナーゼと SSH によるラメリポディア内のアクチン線維ターンオーバーの制御

第56回日本細胞生物学会大会（ワークショップ口演）、大津、2003. 5. 14-16

水野健作

細胞の動くしくみを探る

平成15年度青葉理学会科学講演会、仙台、2003.5.21

大橋一正、渡邊琢也、丹羽隆介、上村 匡、水野健作

Roles of cofilin, LIM-kinase and Slingshot in actin filament dynamics in lamellipodia.

第76回日本生化学会大会（シンポジウム口演）、横浜、2003.10.15-18

執印美加、梶 紀子、大橋一正、水野健作

細胞質分裂におけるコフィリンホスファターゼ Slingshot の役割

第26回日本分子生物学会年会（シンポジウム「細胞質分裂装置の時空的制御機構」口演）、神戸、2003.12.10-13

N. Kaji, K. Ohashi, M. Shuin, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno

Cell cycle-associated changes in activities of cofilin, LIM-kinase, and Slingshot, and their roles in cytokinesis.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

Y. Tsumura, J. Toshima, K. Ohashi, and K. Mizuno

Sprouty4 regulates actin reorganization by inhibiting the kinase activity of TESK1.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

M. Kobayashi, M. Nishita, K. Ohashi, and K. Mizuno

Activation of LIM-kinase-1 by p38 MAP-kinase-dependent phosphorylation in VEGF-induced cell migration.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

K. Ohashi, T. Watanabe, and K. Mizuno

LIM-kinase regulates fascin-based actin bundle formation through cofilin phosphorylation.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec.

13-17, 2003.

K. Mizuno, Y. Ohta, K. Kousaka, K. Nagata-Ohashi, K. Ohashi, A. Muramoto, Y. Shima, R. Niwa, and T. Uemura

Differential activities, subcellular distribution and tissue expression patterns of three members of Slingshot family phosphatases that dephosphorylate cofilin.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

M. Endo, K. Ohashi, Y. Sasaki, Y. Goshima, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno

The roles of LIM-kinase and Slingshot in growth cone motility and morphology.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

M. Nishita, Y. Wang, K. Goto, C. Tomizawa, A. Suzuki, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno

PI3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot-1L controls insulin-induced membrane protrusion.

The 43rd Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 13-17, 2003.

(2004 年)

Y. Ohta, S. Chiba, R. Mori, M. Nishita, K. Kousaka, A. Iwamatsu, R. Niwa, J. Yonekura, T. Uemura, and K. Mizuno

Regulation of cofilin phosphatase Slingshot activity and cell morphology by 14-3-3 proteins.

Gordon Research Conference on "Biology of 14-3-3 Proteins", Ventura, CA, USA, Feb 22-27, 2004.

C. Tomizawa, M. Nishita, Y. Wang, and K. Mizuno

Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion.

The 3rd Japanese Biochemical Society Biofrontier Symposium on "New Aspect of Phospholipid Biology", Kamakura, May 10-12, 2004.

水野健作

細胞の動くしくみを探る

第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム（招待講演）、仙台、2004. 5. 14

水野健作

細胞移動時の極性形成とコフィリンの活性制御

基礎生物学研究所セミナー、岡崎、2004. 6. 24（招待講演）

N. Kaji, M. Shuin, K. Ohashi, R. Niwa, T. Uemura, and K. Mizuno

Roles of cofilin, LIM-kinase, and Slingshot in cytokinesis.

The American Society for Cell Biology 2004 Summer Meeting on "Cytokinesis", Burlington, VT, USA, July 22-25, 2004.

千葉秀平、大橋一永田恭子、太田裕作、後藤一路、森 玲子、西田 満、大橋一正、高坂和芳、岩松明彦、丹羽隆介、上村 匡、水野健作

ニューレグリン刺激によるラメリポディアでのコフィリンホスファターゼ Slingshot とコフィリンの活性化経路

第77回日本生化学会大会（ワークショップ口演）、横浜、2004. 10. 13-16

K. Mizuno, K. Nagata-Ohashi, Y. Ohta, K. Goto, S. Chiba, M. Nishita, K. Ohashi, K. Kousaka, R. Niwa, and T. Uemura

Activation of cofilin phosphatase Slingshot by actin filaments and its control by 14-3-3 proteins.

The 44th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Washington, DC, USA, Dec. 4-8, 2004

梶 紀子、執印美加、大橋一正、丹羽隆介、上村 匡、水野健作

細胞質分裂におけるコフィリン、LIM キナーゼ、Slingshot の役割

第27回日本分子生物学会年会（ワークショップ「細胞質分裂制御におけるタンパ

ク質の動態と情報伝達」)、神戸、2004. 12. 8-11

水野健作

移動細胞の極性形成機構

JST さきがけ 21「遺伝と変化」領域発足 10 周年公開シンポジウム、大阪、2004. 12. 18

(2005 年)

水野健作

コフィリンのリン酸化、脱リン酸化制御と細胞運動

第 2 回リン酸化ネットワーク研究会 (招待講演)、神戸、2005. 5. 20

Kensaku Mizuno

Roles of phosphoregulation of ADF/cofilin in actin dynamics and cell migration.

The 58th Annual Meeting of Japan Society for Cell Biology, Symposium on "Actin Cytoskeleton: Its Dynamics and the Role in Cell Motility", Saitama, June 15-17, 2005 (招待講演)

Y. Ohta, K. Nagata-Ohashi, K. Goto, S. Chiba, R. Mori, M. Nishita, K. Kousaka, A. Iwamatsu, R. Niwa, J. Yonekura, T. Uemura, and K. Mizuno

Activation and translocation to the lamellipodia of cofilin and cofilin-phosphatase Slingshot in neuregulin-induced cell migration.

Gordon Research Conference on "Motile and Contractile Systems", New London, NH, USA, July 10-15, 2005.

Kensaku Mizuno

Spatial and temporal regulation of cofilin activity by LIM-kinase and Slingshot is critical for directional cell migration.

The American Society for Cell Biology 2005 Summer Meeting on "Coordinating the Events of Directed Cell Motility", Seattle, July 27-30, 2005 (招待講演)

水野健作

神経突起伸長の分子メカニズム

第 359 回東北医学会例会シンポジウム「神経再生の諸相」、仙台、2005. 12. 2 (招

待講演)

H. Matsuoka, K. Ohashi, and K. Mizuno

Vav1 regulates the activity and localization of cofilin-phosphatase Slingshot-1L.

The 45th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 10-14, 2005.

M. Kobayashi, M. Nishita, K. Ohashi, and K. Mizuno

VEGF-induced LIM kinase 1 phosphorylation and activation are required for actin cytoskeletal reorganization and migration of endothelial cells.

The 45th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 10-14, 2005.

M. Endo, K. Ohashi, and K. Mizuno

Role of cofilin phosphocycle by LIM kinase and Slingshot in NGF-induced neurite outgrowth.

The 45th Annual Meeting of The American Society for Cell Biology, San Francisco, Dec. 10-14, 2005.

(2006 年)

Kensaku Mizuno

Roles of LIM-kinase and Slingshot in spatiotemporal control of cofilin activity and cell migration.

International Symposium of Kobe University 21st Century COE Program on "Signal Transduction": In Memory of Prof. Yasutomi Nishizuka, Kobe, 2006.2.9-11 (招待講演)

(3) 出版物

1. 十島二郎、水野健作：

3 章 細胞骨格制御における LIMK/TESK ファミリーとコフィリンの機能

細胞の形態形成の基本メカニズム／高井義美他編／金芳堂 (2001) pp. 25-38

2. 水野健作：
II-2 章 LIM キナーゼ
細胞骨格と細胞運動／竹縄忠臣編／シュプリンガーフェアラーク東京（2002）
pp. 114-121
3. 大橋一正、水野健作：
第3章 アクチンの脱重合制御
細胞骨格・運動がわかる／竹縄忠臣編／羊土社（2004） pp. 45-53
4. Kaji, N., and Mizuno, K. :
Roles of cofilin, LIM-kinase, and Slingshot in cytokinesis.
In "Signal Transduction of Cell Division" (Ed. by Miki, T.) Research Signpost, Kerala,
India, pp.125-140 (2005)
5. 西田満、水野健作：
コフィリンのリン酸化と細胞運動
蛋白質核酸酵素（増刊号）「細胞骨格と接着」、51(6), 516-521（2006）
6. 水野健作、遠藤光晴：
神経突起伸長の分子メカニズム
東北医学会誌、印刷中（2006）
7. 水野健作：
LIM キナーゼによるコフィリンリン酸化とアクチン細胞骨格の時空間的制御
実験医学、印刷中（2006）

【研究成果による工業所有権の出願・取得状況】

なし

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。